

Method for separating long-chain nucleic acids

Patent number: DE3639949

Publication date: 1988-06-09

Inventor: HENCO KARSTEN DR [DE]; STICHEL ARNDT [DE]; COLPAN METIN DR [DE]

Applicant: DIAGEN INST MOLEKULARBIO [DE]

Classification:

- **international:** C07H1/08; C07H21/04; G01N30/96; G01N33/68

- **european:** C12N15/10A2B; G01N30/60

Application number: DE19863639949 19861122

Priority number(s): DE19863639949 19861122

Also published as:

- EP0268946 (A2)
- US5057426 (A1)
- JP63150294 (A)
- EP0268946 (A3)
- EP0268946 (B1)

Abstract not available for DE3639949

Abstract of corresponding document: **EP0268946**

Long-chain nucleic acids are separated from other substances from solutions containing nucleic acids and other materials, and more particularly nucleic acid/protein mixtures from biotechnical preparations from bacteria, viruses, animal and vegetable tissues and cells as well as body liquids, more particularly cell ingredients and/or degradation products thereof as well as components of body liquids which components are not long-chain nucleic acids, by that the long-chain nucleic acids in the nucleic acid-containing solutions, or after disintegration under mild conditions of the tissue cells and/or cells from body liquids are fixed on a porous matrix, whereas the substances to be separated therefrom are washed out from the matrix, and the fixed nucleic acids, if desired, are subsequently removed from the matrix. A device for carrying out the method preferably consists of a cartridge (1) containing the porous matrix (11) and having at least one inlet opening (3) and at least one outlet opening (4).

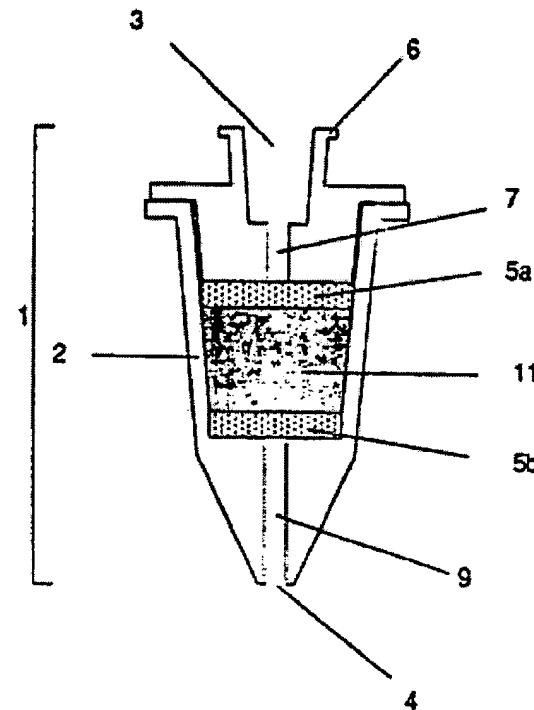


Fig. 3

(19) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

(12) Offenlegungsschrift
(11) DE 3639949 A1

(51) Int. Cl. 4:
C07H 1/08
C 07 H 21/04
G 01 N 30/96
G 01 N 33/68

(21) Aktenzeichen: P 36 39 949.3
(22) Anmeldetag: 22. 11. 86
(23) Offenlegungstag: 9. 6. 88

Schördeneigentum

DE 3639949 A1

(71) Anmelder:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

(74) Vertreter:

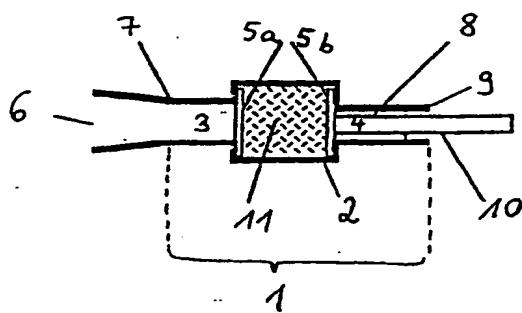
Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Seiting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

(72) Erfinder:

Henco, Karsten, Dr., 4006 Erkrath, DE; Stichel, Arndt,
4000 Düsseldorf, DE; Colpan, Metin, Dr., 4006
Erkrath, DE

(54) Verfahren zur Trennung von langketigen Nukleinsäuren

Langketige Nukleinsäuren werden von anderen Substanzen aus Bakterien, Viren, tierischen und pflanzlichen Geweben und Zellen sowie Körperflüssigkeiten, insbesondere Zellinhaltsstoffen und/oder deren Abbauproduktien sowie Bestandteilen der Körperflüssigkeiten, die nicht langketige Nukleinsäuren sind, dadurch abgetrennt, daß man die langketigen Nukleinsäuren nach dem schonenden Aufschluß der Gewebezellen und/oder Körperflüssigkeiten an einer porösen Matrix fixiert, während die abzutrennenden Substanzen aus der Matrix ausgewaschen werden und die fixierten Nukleinsäuren anschließend von der Matrix abgetrennt werden. Eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens besteht vorzugsweise aus einer Kartusche (1) mit mindestens einer Eintritts- (3) und mindestens einer Austrittsöffnung (4) und enthält die poröse Matrix (11).



DE 3639949 A1

OS 36 39 949

1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung von langkettigen Nukleinsäuren von anderen Substanzen aus Bakterien, Viren, tierischen und pflanzlichen Geweben und Zellen sowie Körperflüssigkeiten, insbesondere Zellinhaltsstoffen und/oder deren Abbauprodukten sowie Bestandteilen der Körperflüssigkeiten, die nicht langkettige Nukleinsäuren sind, dadurch gekennzeichnet, daß die langkettigen Nukleinsäuren der Gewebezellen und/oder Zellen aus Körperflüssigkeiten nach dem schonenden Aufschluß an einer porösen Matrix fixiert werden, während die abzutrennenden Substanzen aus der Matrix ausgewaschen werden und die fixierten Nukleinsäuren anschließend von der Matrix abgetrennt werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix aus modifiziertem Silicagel besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix ein Anionenaustauscher ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße des Silicagel-Basismaterials 15 bis 250 µm und der Porendurchmesser 100 bis 2500 nm beträgt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße des Silicagel-Basismaterials 25 bis 40 µm und der Porendurchmesser ca. 400 nm beträgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Abtrennung der langkettigen Nukleinsäuren in Lösungen erfolgt, die frei von Phenol sind.
7. Verfahren nach einem Ansprache 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß Materialien mit hydrophilen Oberflächen verwandt werden.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der schonende Aufschluß durch enzymatische Proteolyse und/oder in Anwesenheit von Detergenzien und/oder in Anwesenheit denaturierender Agentien oder in Kombination mit mechanischen Verfahren erfolgt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Auswaschen der abzutrennenden Substanzen mittels einer Waschlösung niedriger Ionenstärke und die nachträgliche Abtrennung der langkettigen Nukleinsäure von der Matrix mittels einer Lösung hoher Ionenstärke geschieht.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennung der langkettigen Nukleinsäuren im Batch-Verfahren erfolgt.
11. Verwendung einer porösen Matrix zur Trennung von langkettigen Nukleinsäuren von anderen Substanzen aus Gewebe und Körperflüssigkeiten, wobei die langkettigen Nukleinsäuren an die poröse Matrix fixiert, die übrigen Substanzen ausgewaschen und die langkettigen Nukleinsäuren danach von der Matrix abgetrennt werden.
12. Verwendung einer porösen Matrix nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix aus modifiziertem Silicagel besteht.
13. Verwendung einer porösen Matrix nach einem der Ansprüche 10 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix ein Anionenaustauscher ist.
14. Verwendung einer porösen Matrix nach An-

2

- sprüchen 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Partikelgröße der porösen Matrix 15 bis 250 µm und der Porendurchmesser 100 bis 2500 nm beträgt.
15. Verwendung einer porösen Matrix nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet daß die Partikelgröße der porösen Matrix 25 bis 40 µm und der Porendurchmesser ca. 400 nm beträgt.
 16. Verwendung einer porösen Matrix nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix ein Anionenaustauscher ist.
 17. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens gemäß Ansprüchen 1 bis 9, bestehend aus einer porösen Matrix in einem Behälter mit mindestens einer Eintritts- und mindestens einer Austrittsöffnung.
 18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix aus einem Anionenaustauscher besteht.
 19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 und 18, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Matrix aus modifiziertem Silicagel besteht.
 20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter eine Kartusche (1) ist.
 21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Kartusche (1) mindestens eine Eintritts- (3) und mindestens eine Austrittsöffnung (4) aufweist.
 22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Seitenwände (2) der Kartusche (1) aus Kunststoff bestehen.
 23. Vorrichtung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Kunststoff PTFE ist.
 24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Seitenwände (2) der Kartusche (1) aus hydrophilem Material bestehen.
 25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 17 bis 22 und 24, dadurch gekennzeichnet, daß die die Kartusche abschließenden Filter (5a) und (5b) aus hydrophilem Material bestehen.

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Trennung von langkettigen Nukleinsäuren von anderen Substanzen aus Bakterien, Viren, tierischen und pflanzlichen Geweben und Zellen, insbesondere Zellinhaltsstoffen und/oder deren Abbauprodukten sowie Bestandteilen der Körperflüssigkeiten, die nicht langkettige Nukleinsäuren sind, sowie die Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

Die Nukleinsäurepräparation aus natürlichen Quellen, insbesondere aus Viren, bakteriellen oder eukaryotischen Zellen, Zellverbänden oder Geweben sowie Körperflüssigkeiten ist eine Schlüsseltechnik für verschiedene präparative und analytische Problemlösungen in der Biologie und Medizin. Einige wichtige Anwendungen seien im folgenden exemplarisch genannt:

Die Molekularbiologie bedient sich replikationsfähiger Vehikel für DNS-Fragmente, zu denen Plasmide, Phagen, Viren usw. gehören. Um die DNS- oder RNS-prozessierenden Enzyme anwenden zu können, bedarf es zunächst einer hochgereinigten DNS oder RNS. Ähnliches gilt für die genetische Analytik von beispielsweise Viren aus Gewebsflüssigkeiten oder genomischer DNS aus Gewebe. Da zum spezifischen Nachweis bestimm-

OS 36 39 949

3

4

ter Charakteristika von Nukleinsäuren wie zum Beispiel Restriktionspolymorphismen diese Nukleinsäuren vor der Analyse einer enzymatischen Spaltung unterworfen werden, müssen sie in einer solchen Reinheit vorliegen, daß diese enzymatischen Prozessierungen durchführbar sind. Die bislang bekannten Verfahren erlauben es nicht, aus so unterschiedlichen Ausgangsmaterialien wie Gewebe, Blut, Sputum, Zellkulturen, Bakterien, Pilzen, renalen und fäkalen Exkrementen die DNS/ RNA nach ähnlichen und einfachen Arbeitsanweisungen zu extrahieren und zu konzentrieren.

Die Problematik wird besonders deutlich, wenn man an die Virusdiagnostik, zum Beispiel Hepatitis B-DNS-Nachweis in Blut und Leberbiopsien, die Individualzuordnung in der Kriminalistik, der forensischen Medizin oder der Vaterschaftsanalyse denkt, wobei zur Analyse zelluläre Nukleinsäuren aus so unterschiedlichen Quellen wie Spermien, Gewebe (frisch, verkohlt, gefroren, eingetrocknet usw.) erhalten werden müssen für die technisch jeweils vergleichbare Art der Folgeanalyse.

Die bisher bekannten Verfahren zur Reinigung langketiger Nukleinsäuren verlangen längere Zentrifugationsstufen oder wäßrige Phenol/Zweiphasenextraktionen.

Solche Verfahren sind sehr personal- und kostenintensiv und außerdem zu aufwendig, um sie im automatisierten Betrieb einfach zu realisieren. Die bekannten und gebräuchlichen Reinigungsverfahren benötigen weiterhin kostspielige Geräte, insbesondere Kühlzentrifugen und Ultrazentrifugen, die überdies noch wertvolles Material wie Cäsiumchlorid für Dichtegradienten-Zentrifugation oder Rotoreinsätze für den Einmalgebrauch verbrauchen.

Ein Verfahren, das in EP-A-83 901 065 beschrieben ist und auf dem Einsatz von HPLC-Geräten basiert, eignet sich zwar zur chromatographischen Auf trennung von Nukleinsäuren, jedoch werden langketige Nukleinsäuren wie zum Beispiel λ -Phagen-DNS durch mechanische Einwirkung beschädigt. Aus Bernardi, G. (1971), "Methods in Enzymology" (Grossman, L. & Moldave, K., Hrsg.) Band 21, Seiten 95 bis 139, Academic Press, New York, ist ein Verfahren bekannt zur Abtrennung von Nukleinsäuren von Proteinen, niedermolekularen Substanzen und zellulären Bestandteilen wie Oligo- und Polysacchariden durch chromatographische Reinigung an Hydroxylapatit (HAP).

Dieses Verfahren wurde auch zur Reinigung von Plasmide und -Phagen-DNS eingesetzt (siehe Colman A. et al, 1978, Eur. J. Biochem. 91, 303 bis 310; Shoyab, M. & Sen, A., 1978, J. Biol. Chem. 253, 6654 bis 6656; und Johnson, T.R. & Ilan, J., 1983, Anal. Biochem. 132, 20 bis 25). Das Verfahren ist jedoch nicht mit dem erfundungs gemäßen Verfahren vergleichbar. So ist beispielsweise die Kapazität der Trennleistung in mg Nukleinsäure bezogen auf g Trenngel mit ca. 1 mg/g im erfundungs gemäßen Verfahren etwa 100mal höher als beim HAP-Verfahren. Die Trennung auf HAP ergibt für langketige Nukleinsäuren hohe Ausbeuteverluste, insbesondere bei zellulärer DNS, und erfordert hohe Phosphat- und Harnstoffkonzentrationen im Elutionspuffer, was sich bei der Weiterverarbeitung der aufgetrennten langketigen DNS störend auswirkt. Die bekannten Gelpermationsverfahren sind nicht in der Lage, hochmolekulare Nukleinsäuren von anderen hochmolekularen Substanzen wie Proteinen und Polysacchariden zu trennen, da diese Materialien lediglich nach Größe und Form selektieren.

Für die direkte Hybridisierungsreaktion ist gewöhn-

lich die Produktreinheit, die nach bekannten Verfahren erzielt wird, hinreichend. Für eine Anzahl von Nachweisproblemen ist die Konzentration der gereinigten, langketigen Nukleinsäure jedoch zu gering, als daß ein direkter Hybridisierungsnachweis möglich ist. Als Beispiele seien genannt die Analytik von AIDS-Virus-Nukleinsäuren in stark unterrepräsentierten infizierten Zellen einer Lymphknotenbiopsie oder der Nachweis eines Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) in einer kleinen Menge Zellen, die bei einer Amniozentese oder Chorionbiopsie anfallen.

Sollen spezifische Nukleinsäuresequenzen enzymatisch amplifiziert werden, so muß die zu amplifizierende Nukleinsäure in einer Reinheit vorliegen, die es ermöglicht, daß Enzyme, wie Polymerasen, nicht inhibiert werden (Saiki, R.K. et al, 1985, Science 230, 1350 bis 1354). Ein essentieller Reinigungsschritt der bekannten Verfahren ist der Einsatz einer phenolischen Extraktion, um effizient die Entfernung von Proteinen und organischen Agentien, die Enzyme hemmen können, zu erreichen. Phenol ist jedoch ein starkes Haut- und Lebergift und sollte nur unter Sicherheitsvorkehrungen und von gut geschultem Personal verarbeitet werden. Zudem sind Flüssigextraktionen zeit- und personalintensiv.

Bisher konnten nur in Forschungslaboren derartige Reinigungen von langketigen Nukleinsäuren, insbesondere innerhalb der Molekularbiologie, durchgeführt werden, da die bekannten Verfahren zeitaufwendig, instrumentations- und kostenintensiv und aufgrund der verwendeten Chemikalien wie Phenol überdies gesundheitsschädlich sind. Eine typische Arbeitsanleitung läßt sich in folgende Schritte aufteilen:

- a) der Aufschluß der Zellen oder Gewebe oder Körperflüssigkeiten, der mittels einer Reihe von Verfahren wie mechanische Verfahren (zum Beispiel Mühle) in Kombination mit physikalischen Verfahren (zum Beispiel Koch-Verfahren — "boiling procedure"), mit enzymatischen Verfahren (zum Beispiel Proteinase K, Lysozym etc.) und mit chemischen Verfahren (zum Beispiel Natronlauge, Diethylpyrocarbonat) geschehen kann und der die Zellinhale für weitere Enzyme und Reagentien zugänglich macht,
- b) grobe Klärung der Lösung von Zelltrümmern in der Zentrifuge,
- c) Schritte zur Proteinentfernung und erste Anreicherung der Nukleinsäure, gewöhnlich unter Zuhilfenahme eines Zweiphasensystems, bestehend aus phenolischer Phase/wäßriger Phase, und
- d) Hochreinigungstechniken wie Ultrazentrifugation.

Den bekannten Verfahren zur Reinigung langketiger Nukleinsäuren ($> 20 \text{ kB} \triangleq \text{Molekulargewicht} > 13$ Millionen Dalton) ist gemeinsam, daß sie sich nur schwer rationalisieren lassen, falls die Nukleinsäurepräparationen routinemäßig durchgeführt werden sollen. Dieser Zustand ist beispielsweise gegeben in Laboratorien der Molekularbiologie, die ständig hochreine Plasmide oder Phagen-DNS bereitstellen müssen.

In der medizinischen Diagnostik besteht das dringende Bedürfnis, neue Aussagen durch die Analyse genetischen Materials zu erhalten. Erwähnt sei das Problem der Hepatitis-Diagnostik, wobei nur der direkte Virusnachweis Aufschluß über eine Infektiosität erlaubt, oder der genetische Nachweis einer erblich bedingten Proteindefizienz, zum Beispiel einer Thalassämie. Die Auf-

OS 36 39 949

5

arbeitung des zu analysierenden Materials (DNS oder RNS), insbesondere bei großen Probenzahlen, erweist sich als entscheidendes Hindernis auf dem Weg zu einer Diagnostik auf genetischer Basis, wenn sie den bekannten serologischen Verfahren in ihrer massenmäßigen Anwendbarkeit gleichkommen soll.

Die Bedeutung einer automatisierten Nukleinsäureaufarbeitung ist außerordentlich groß. Diese Verfahrensweise ist die Voraussetzung für eine allgemein anwendbare Diagnostik auf genetischer Ebene, die in ihrer Bedeutung den verbreiteten serologischen Diagnosemethoden entsprechen könnte.

Beide Verfahren decken Bereiche ab, deren Aussagen sich in komplementärer Weise ergänzen.

Während in der Immunologie qualitativ und quantitativ die Zell- oder Virusprodukte bestimmt werden können, findet bei der genomischen Analyse die Diagnose auf der Ebene des Informationsspeichers der Nukleinäsäure statt.

Die Gentechnologie ermöglicht eine extrem hochauflösende Diagnostik, indem nahezu jeder einzelne Baustein der bis zu Milliarden Bausteine umfassenden Erbspeicher geprüft werden kann. Die Verfahrensweise erlaubt, die An- oder Abwesenheit infektiösen Erbmaterias, beispielsweise eines AIDS-Erregers, zu bestimmen oder genetische Erkrankungen zu erkennen wie Muskeldystrophie, ohne daß Genprodukte in Form von beispielsweise Protein/Antigenen exprimiert werden müssen oder das Fehlen derselben festgestellt werden muß.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfundung besteht also in einem Verfahren zur Trennung langkettiger Nukleinäsäuren aus Gewebe und Körperflüssigkeiten, das

- a) es in gleicher Weise erlaubt, aus unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien wie Gewebe, Blut, Spucke, Zellkulturen, Bakterien, Pilzen, renalen und fäkalen Exkrementen sowie pflanzlichem Gewebe aus Kalluskulturen, Wurzeln etc. die Nukleinäsäuren in ähnlicher Weise zu extrahieren und zu konzentrieren,
- b) keine längeren Zentrifugationsschritte, insbesondere Ultrazentrifugationen, verlangt,
- c) ohne kostspielige Geräte, insbesondere Kühlzentrifugen und Ultrazentrifugen, und ohne wertvolles Material wie Cäsiumchlorid für Dichtegradienten oder Rotoreinsätze für Einmalgebrauch auskommt,
- d) eine hohe Reinheit der Nukleinäsäure garantiert,
- e) auf phenolische Extraktion verzichten kann und
- f) eine Automatisierung ermöglicht.

In der EP-A-83 901 065 ist ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinäsäuren bis hin zur Plasmidgröße (< 10000 Basenpaare \approx 6 Millionen Dalton) beschrieben. Mit Hilfe des dort beschriebenen Materials, das sich dadurch auszeichnet, daß ein hochporöses Silicagel als Träger verwendet wird, das mit einer Anionenaustauscherbeschichtung versehen ist und in der HPLC-Chromatographie eingesetzt wird, lassen sich zum Beispiel vorgereinigte Plasmide hochrein darstellen. Dennoch sind auch hier Zentrifugationsschritte und Präzipitationsschritte notwendig, die für eine Anwendung in der Massenanalyse bzw. -präparation nicht geeignet sind. Ein entscheidender Nachteil besteht darin, daß bei größeren Molekülen, zum Beispiel λ -Phagen-DNS, während der chromatographischen Trennung mit Partikel < 10 μm die Scherkräfte so groß werden, daß die Moleküle nicht mehr intakt isoliert werden können. Das trifft umso mehr auf zelluläre DNS mit vielfachen Längen im

6

Vergleich zu λ -DNS zu.

Die Aufgabe wird erfundungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, in dem die langkettigen Nukleinäsäuren aus Bakterienzellen, Viren, pflanzlichen und tierischen Gewebezellen und/oder Zellen aus Körperflüssigkeiten nach dem schonenden Aufschluß an einer porösen Matrix fixiert werden, während die abzutrennenden Substanzen aus der Matrix ausgewaschen werden und die fixierten Nukleinäsäuren anschließend von der Matrix abgetrennt werden.

Die poröse Matrix besteht vorzugsweise aus modifizierten Silicagel-Partikeln mit einer Partikelgröße von 15 bis 250 μm , vorzugsweise 25 bis 40 μm . Die Poren weisen Durchmesser von 100 bis 2500 nm, vorzugsweise ca. 400 nm auf. Die Modifizierung des Silicagels erfolgt vorzugsweise dadurch, daß das Trägermaterial mit einem Silanisierungsreagens zu einem Anionenaustauscher umgesetzt wird.

Wie in EP-A-83 901 065 offenbart, geht man dabei zum Beispiel von γ -Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und N,N-Dimethylaminoethanol aus.

Das erfundungsgemäße Verfahren ermöglicht dabei unter anderem den Verzicht auf phenolische Extraktion des zu untersuchenden Aufschlusses zur Reinigung der langkettigen Nukleinäsäuren von störenden Bestandteilen.

Es empfiehlt sich bei Anwendung des erfundungsgemäßen Verfahrens, hydrophile Oberflächen zu verwenden, da Nukleinäsäuren, insbesondere langkettige Nukleinäsäuren dahin tendieren, feste Wechselwirkungen mit der Matrix einzugehen, wenn Salzlösungen hoher Ionenstärke verwendet werden. Die starken hydrophoben Wechselwirkungen können zu Kontaminations- und Ausbeuteproblemen führen.

Die schonende enzymatische Proteolyse kann entweder allein oder auch in Kombination mit mechanischen Mitteln erfolgen. Es stehen eine Reihe von Verfahren zur Verfügung, nämlich mechanische Verfahren (zum Beispiel Mühle) in Kombination mit physikalischen Verfahren (zum Beispiel Koch-Verfahren – "boiling procedure"), enzymatische Verfahren (zum Beispiel Proteinase K, Lysozym etc.) und chemische Verfahren (zum Beispiel Natronlauge, Diethylpyrocarbonat).

Diese Verfahren lassen sich entweder allein oder in Kombination mit dem erfundungsgemäßen Verfahren zur Extraktion langkettiger Nukleinäsäuren einsetzen. Einige dieser bekannten Verfahren (T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook (CSH), 1982, "Molecular cloning" (C.S.H.)) verwenden Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Sarcosyl als Detergens bzw. solubilisierendes und proteindenaturierendes Agens. In Anwesenheit von mehr als 0,1% SDS (bevorzugt verwendet werden 0,1 bis 2%) wird die Bindung von DNS/RNS an die die polykationische Oberfläche des Trägers beeinflußt und stark herabgesetzt. Ist SDS für den Aufschluß unvermeidlich, dann muß die wäßrige Phase mit Phenol und/oder Chloroform versetzt werden, d.h. eine Flüssig/Flüssig-Extraktion ist notwendig, um das SDS zu entfernen. Eine Alternative besteht in einem dem erfundungsgemäßen Verfahren vorgesetzten Festphasenextraktionsschritt mittels hydrophob beschichteter Träger (Reversed-Phase-Trägern).

Die von den langkettigen Nukleinäsäuren abzutrennenden Substanzen werden nach dem erfundungsgemäßen Verfahren durch gründliches Auswaschen mittels einer Waschlösung niedriger Ionenstärke entfernt. Die Abtrennung der langkettigen Nukleinäsäure von der Matrix geschieht durch Spülen der porösen Matrix mit ei-

OS 36 39 949

7

8

ner Lösung hoher Ionenstärke (Salzkonzentration).

Bei der Reinigung von Plasmid-DNS, zum Beispiel aus rekombinanten *E. coli*-Bakterien, können unterschiedliche Aufschlußverfahren für die Wirtszellen verwendet werden. Sie alle führen nach einer Zentrifugation bei ca. 12000 g zu dem sogenannten klaren Lysat, einem von Zellbruchstücken und der chromosomalen DNS weitgehend befreiten klaren Überstand, der Plasmid-DNS, RNS, Proteine und andere lösliche Bestandteile enthält.

Es seien genannt das Lysozym/Triton bzw. SDS-Verfahren (siehe Maniatis et al.), das NaOH/SDS-Verfahren (Birnboim, H.C. & Doly, I., 1979, Nucl. Acids Res. 7, 1513 bis 1523; Ish-Horowicz, D. & Burke, J.F., 1981, Nucl. Acids Res. 9, 2989 bis 2998), das Phenolverfahren (Klein, R.D. et al., 1980, Plasmid, 3, 88 bis 91) und das "Boiling"-Verfahren (Holmes, D.S. & Quigley, M., 1981, Anal. Biochem. 114, 193 bis 197).

Die klaren Lysate können, sofern sie keine nennenswerten Mengen (<0,01%) an ionischen Detergentien wie SDS enthalten, direkt nach dem erfundungsgemäßen Verfahren gereinigt werden, wobei durch die Wahl der geeigneten Ionenstärkebedingungen (vorzugsweise 0,5 bis 0,7 M) über Adsorption an die poröse Matrix zum Beispiel Proteine, Lipide, RNS und kleinere Moleküle von langkettiger DNS, insbesondere von Plasmiden, abgetrennt werden, indem letztere an das Trägermaterial bindet. Durch Zusatz von Harnstoff im Auftragspuffer wird das Bindungsverhalten der langkettigen DNS nicht beeinflußt, jedoch die Trennleistung gegenüber Proteinen optimiert. Auf diese Weise kann die hohe Kapazität des Materials von ca. 1 µg Nukleinsäure pro 1 mg der porösen Matrix spezifisch für die DNS genutzt werden trotz des hohen molaren Überschusses an zellulärer RNS.

Unspezifisch gebundene RNS und Proteine werden durch Waschen mit Pufferlösungen geringer Ionenstärke in wenigen Waschschritten von der porösen Matrix entfernt.

Die Elution findet anschließend durch Extraktion der porösen Matrix mit Puffern hoher Ionenstärke statt.

Aufgrund der außergewöhnlichen Trennleistung des erfundungsgemäßen Verfahrens zwischen RNS/Protein einerseits und langkettiger DNS andererseits ist eine sich üblicherweise anschließende RNase- und eventuell Proteinasebehandlung nicht notwendig. Wenn das klare Lysat SDSfrei ist wie nach Kaliumacetat-Fällung oder wie es durch Lysozym/Triton-X-100-Lyse erzeugt wird, kann nach Einstellung einer Ionenstärke von 0,5 bis 0,7 M das Lysat direkt über die poröse Matrix geleitet werden, um auf diese Weise langkettige Plasmide zu extrahieren. Andernfalls können SDS und Proteine zuvor durch Phenolisierung und Versetzen mit Chloroform extrahiert werden, worauf sich die DNS-Extraktion durch das erfundungsgemäße Verfahren anschließt. In Lysat gelöstes Phenol interferiert nicht mit dem Plasmid-Bindungsverhalten der porösen Matrix.

Ist das Volumen der Lysate sehr groß, empfiehlt sich zunächst eine DNS-Präzipitation durch Polyethylenglycol (PEG), Ethanol oder Isopropanol. Danach wird das Pellet in Tris-Puffer gelöst, die Lösung auf die gewünschte Ionenstärke eingestellt und über die poröse Matrix geleitet. Dadurch wird die DNS aus der Lösung extrahiert, in nachfolgenden Waschvorgängen mit Puffer geringer Ionenstärke gewaschen und anschließend mit Tris-Puffer hoher Ionenstärke wieder extrahiert. Anschließend kann die DNS, wenn gewünscht, durch a) Dialyse, b) Präzipitation oder c) Gelpermeations-Chro-

matographie entsalzt werden.

Die nach dem erfundungsgemäßen Verfahren isolierte Plasmid-DNS zeigt mindestens ebenso gute Eigenschaften wie die mittels bekannten Reinigungsverfahren isolierte.

Die Plasmid-DNS kann prozessiert werden mit Restriktionsenzymen und DNS-Ligasen; des weiteren ist die DNS sequenzierbar und transfektierbar.

λ -Phagen sind häufig verwendete Transportvehikel für rekombinante Nukleinsäuren und werden für viele Anwendungen den Plasmidvektoren vorgezogen, da sie

- a) nach Proteineinkapselung (*in vitro packaging*) sehr effizient Fremd-DNS in Zellen einschleusen und sich so zur Errichtung umfangreicher Genbänke eignen,
- b) sowohl kleine als auch sehr große DNS-Fragmente aufnehmen können,
- c) eine gute Lagerfähigkeit haben und
- d) leicht zu züchten sind.

Viele Klonierungsexperimente beginnen mit der Errichtung einer λ -Genbank, insbesondere einer statistisch errichteten Genbank. Da auf dieser Stufe nur ungenügend charakterisierte DNS eingesetzt wird, ist die Gewährleistung der biologischen Sicherheit oft problematisch.

So müssen zum Beispiel bei der Klonierung onkogener Sequenzen oder viralier Sequenzen (HTLV-III/LAV-1) Sicherheitsstämme und Sicherheitsphagen der biologischen Sicherheitsstufe 2 (B2) eingesetzt werden und unter hoher Laborsicherheit (L2 oder L3, ZKBS, Berlin, siehe V. überarbeitete Fassung für den Umgang mit neurekombinierter DNS) aufgearbeitet werden. Hierbei stellen Aufarbeitungsschritte wie Zentrifugationen, insbesondere aufwendige, langwierige und kostspielige Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugationen und das Ernten der Phagen Sicherheitsprobleme für Labor und Personal dar.

Das erfundungsgemäße Verfahren ermöglicht die Reinigung von Phagen/Phagen-DNS unter Umgehung von Zentrifugationsschritten. Eine gewachsene bzw. lysierte Bakterienkultur kann gegebenenfalls vollständig in einer Sterilbank aufgearbeitet werden bis hin zur reinen λ -DNS mit einer solchen Reinheit, die den cäsiumchlorid-gereinigten Präparationen entspricht.

Zur Isolierung zellulärer DNS aus Gewebe unterschiedlichster Herkunft wird das Material nach bekannten Verfahren aufgeschlossen. So wird nach einer mechanischen Homogenisierung, zum Beispiel unter Stickstoff, in einer Kugelmühle oder durch effizientes Zerquetschen und Scheren des Materials ein proteolytischer Aufschluß in Gegenwart denaturierender und/oder solubilisierender Agentien angeschlossen. Proteinase K ist ein bevorzugtes Enzym für den proteolytischen Aufschluß, da es noch in Gegenwart von 1% SDS und EDTA effizient zur Lyse von Zellen und Zellkernen führt. Nach dem Stand der Technik müssen anschließend in zeitaufwendigen Flüssig/Flüssig-Extraktionen das SDS und die Proteine entfernt werden, woran sich eine Dialyse und Präzipitation der DNS anschließt. Diese Verfahrensweise ist aufwendig und nur schwer zu automatisieren. Das erfundungsgemäße Verfahren erlaubt es jedoch, langkettige DNS unter schonenden Bedingungen aus den erwähnten Probenmaterialien in Lösung zu bringen, die DNS unter Umgehung von Phenol-Extraktionsschritten an die poröse Matrix zu fixieren, zu waschen und anschließend schonend in einem kleinen

OS 36 39 949

9

10

Volumen zu eluieren (0,5 bis 5 ml, vorzugsweise 1 bis 3 ml).

Infektionen mit Viren spielen eine wichtige Rolle in der Transfusions- und Transplantationsmedizin und generell bei immunsupprimierten Patienten. Beispieleise kann eine akute CMV (Cytomegalievirus)-Infektion durch Analyse renaler Exkremeute nachgewiesen werden. Nach dem Stand der Technik werden die Bakterien durch einen Filtrationsschritt oder low-speed-Zentrifugationsschritt vom Urin abgetrennt und danach die Virus-DNS aus der Proteinhülle freigesetzt und durch gleichzeitig stattfindende Konzentrierung gereinigt. Hierfür sind nach dem Stand der Technik Ultrazentrifugen eingesetzt worden.

Das erfindungsgemäße Verfahren nutzt die beschriebene poröse Matrix, indem CMV -Viren in situ nach Zusatz von Harnstoff, Detergenz und Puffer lysiert werden, wobei die DNS (130 bis 150 x 10⁶ Dalton) freigesetzt wird.

Durch Adsorption an die poröse Matrix wird die DNS konzentriert und mit Puffern niedriger Ionenstärke gewaschen. Anschließend wird die DNS mit einem Puffer hoher Ionenstärke eluiert. Wenn sich der weiteren Analyse ein Dot-Blot-Verfahren anschließt, ist eine Entsalzung der DNS nicht erforderlich.

Die Verwendung einer porösen Matrix, die auf Silicagel-Partikel basiert, deren Oberfläche so modifiziert ist, daß die Matrix Anionenaustauscheraktivitäten aufweist, gewährleistet die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die Partikelgröße der porösen Matrix beträgt 15 bis 250 µm, vorzugsweise 25 bis 40 µm, und der Porendurchmesser 100 bis 2500 nm, vorzugsweise ca. 400 nm.

Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht aus einem Behälter, hergestellt aus einem Material, das den Einsatzbedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens widersteht. Der Behälter nimmt die poröse Matrix auf und besitzt mindestens eine Einlaß- und Auslaßöffnung.

Der Behälter (siehe Abbildung) für die poröse Matrix besteht gemäß einer bevorzugten Ausführungsform aus einer Kartusche (1), die vorzugsweise einen im wesentlichen zylindrischen Hohlkörper bildet und deren Seitenwände (2) aus einem Material bestehen, das den Einsatzbedingungen (Anwesenheit mehr oder weniger aggressiver Chemikalien und korrosiver Salze) widersteht. Vorzugsweise bestehen die Seitenwände (2) aus Kunststoff.

Besonders einfach ist die Herstellung der Kartuschen unter Verwendung eines Schrumpfschlauches, beispielsweise aus Polytetrafluoroethylen (PTFE). Die Einlaß(3) und Auslaßöffnung (4) werden durch Filter (5a) und (5b) begrenzt. In einer bevorzugten Ausführungsform bestehen die Filter aus hydrophilem Material wie Glas, hydrophilem Kunststoff oder Kunststoff, der mit hydrophilem Material beschichtet ist. Es können aber auch hydrophobe Materialien eingesetzt werden. Die Eintrittsöffnung (3) kann gewünschtenfalls so ausgestaltet werden, daß ein Luer-Lock-System (6) direkt an die Eintrittskanüle (7) anschließbar ist. Die Austrittsöffnung (4) besitzt in einer bevorzugten Ausführungsform einen innen liegenden Schlauch (8), vorzugsweise aus Silicon, der an das Filter (5b) anschließt und vorzugsweise nicht über das Ende der Austrittskanüle (9) hinausragt. Das Kartuscheneluat wird durch einen Schlauch (10) abgeleitet, der vorzugsweise aus Kunststoff, besonders bevorzugt aus hydrophilem Kunststoff besteht. Es können aber auch hydrophobe Kunststoffe wie PTFE eingesetzt

werden.

Das Lumen des Behälters für die poröse Matrix (11) ist abhängig vom Verwendungszweck. Üblicherweise beträgt das Innenvolumen bei analytischen Verfahren etwa 0,02 bis 5 cm³, vorzugsweise 0,1 bis 1 cm³. Die poröse Matrix (11) besteht vorzugsweise aus einem Anionenaustauscher auf Silicagel-Basis. Der Porendurchmesser des Materials beträgt 100 bis 2500 nm, vorzugsweise ca. 400 nm bei einer Partikelgröße von 15 bis 250 µm, vorzugsweise 25 bis 40 µm.

Das Gemisch von aufgeschlossenen Zellen aus Gewebe oder Körperflüssigkeiten wird nach der schonenden Proteolyse, gegebenenfalls in Kombination mit mechanischen Mitteln, durch die Eintrittsöffnung in die Kartusche geführt und kommt mit der porösen Matrix in innige Berührung. Dabei entzieht die poröse Matrix dem Gemisch die langketigen Nukleinsäuren, während die anderen Substanzen die Kartusche durch die Austrittsöffnung verlassen. Es ist dabei darauf zu achten, daß das Applikationsgemisch des aufgeschlossenen Materials eine niedrige Ionenstärke besitzt. Beispielsweise werden bei ca. 300 mM NaCl langketige RNA und DNA adsorbiert, jedoch Proteine und niedermolekulare Substanzen in nicht nennenswertem Maße; bei Konzentrationen größer 500 mM NaCl binden nur noch langketige Einzelstrang-DNA und Doppelstrang-DNA, und bei Salzkonzentrationen um 700 mM NaCl wird dann nur noch langketige doppelsträngige DNA an der porösen Matrix adsorbiert. Wird die poröse Matrix unter Bedingungen synthetisiert, die nicht zur maximalen Oberflächenladungsdichte führen, verschiebt sich das Trennprofil insgesamt zu niedrigeren Ionenstärken, ohne daß die Trennleistung signifikant beeinflußt wird. Dieser Effekt ist sogar erwünscht, wenn man die DNA bei niedriger Salzkonzentration eluieren muß.

Nachdem die Probe die Kartusche verlassen hat, spült man die Kartusche sorgfältig mit einer Waschlösung von erwünschter Ionenstärke (wie oben ausgeführt), um danach die langketigen Nukleinsäuren von der porösen Matrix zu desorbierten. Dies geschieht in einfacher Weise durch Spülen mit einer Lösung hoher Ionenstärke. Dazu kann die zweite Lösung im einfachsten Fall durch die gleiche Eintrittsöffnung (3) eingeleitet und die gleiche Austrittsöffnung (4) abgeleitet werden. Gewünschtenfalls können aber auch Kartuschen verwendet werden, die für die Lösung geringerer Ionenstärke und die Lösung hoher Ionenstärke verschiedene Eintrittsöffnungen und verschiedene Austrittsöffnungen aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich in einer weiteren Ausführungsform als "Batch"-Verfahren realisieren, das sich durch besonders einfache Handhabung auszeichnet. Eine zur Extraktion der langketigen Nukleinsäuren geeignete poröse Matrix wird in einer ausreichenden Menge in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit der zu extrahierenden Probe innig gemischt, wobei die erwünschte Ionenstärke der Lösung wie oben angegeben einzustellen ist. Dabei werden die langketigen Nukleinsäuren an der porösen Matrix adsorbiert. Durch mehrere Waschschritte werden die kontaminiierenden Bestandteile abgetrennt. Danach werden die langketigen Nukleinsäuren durch Elution mit einem Puffer erwünschter Ionenstärke schonend von der porösen Matrix abgetrennt. Die poröse Matrix besteht vorzugsweise aus einem Anionenaustauscher auf der Basis eines modifizierten Silicagels mit einem Porendurchmesser von 100 bis 2500 nm, vorzugsweise ca. 400 nm und einer Partikelgröße von 15 bis 250 µm, vorzugsweise 25 bis 40 µm.

OS 36 39 949

11

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Die Präparation eines Plasmids (2860 Basenpaare) geschieht wie folgt:

Im Anschluß an das Alkali/SDS-Aufschlußverfahren wird eine 100 ml-Multur in LB-Ampicillin-Medium (siehe Maniatis et al.) mit plasmid-transformierten HB-101 E. coli-Zellen 10 Minuten bei 5000 g und 5°C zentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig dekantiert und das Zell-Pellet in 2 ml 50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCL pH 8,0, 10 mM EDTA resuspendiert.

Nach fünfminütigem Stehen bei 20°C werden 4 ml frisch angesetzte 18ige SDS-Lösung in 0,2 M NaOH zugesetzt, vorsichtig gemischt und 5 Minuten auf Eis inkubiert.

Danach werden 3 ml kalte Natriumacetat-Lösung (3M Na-Acetat, 2M Essigsäure) zugesetzt, vorsichtig gemischt und für eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei ca. 10000 g, 10°C erhält man einen klaren, plasmidhaltigen Überstand. Wird anstelle von Natriumacetat Kaliumacetat eingesetzt, so wird das SDS weitestgehend ausgefällt.

Bei großen Lysatvolumina empfiehlt sich zunächst eine DNS-Präzipitation durch PEG, Ethanol oder Isopropanol. Danach wird das Pellet in 10 mM Tris-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA gelöst, auf 0,6 M NaCl eingestellt und über 200 mg des Trenngels geleitet. Dadurch wird die DNS (ca. 1100 µg) aus der Lösung extrahiert. Im nachfolgenden Waschvorgang wird mit 0,8 M NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA auf dem Gel gewaschen und mit ca. 1 ml 1,2 M NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA wieder extrahiert. Anschließend kann die DNS durch Dialyse, Präzipitation oder Gelpermeations-Chromatographie entsalzt werden.

Beispiel 2

Die Präparation von λ-Phagen-DNS geschieht wie folgt:

Eine gewachsene und lysierte λ-Phagen/E. coli-Kultur (50 ml) wird bei 5000 g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert oder auf Eis für 30 Minuten stehen gelassen (siehe Maniatis, T. et al.). Die Überstände oder Teile davon werden über engporige Sterilfilter, zum Beispiel 0,45 µm, filtriert, um intakte Zellen oder floatierende Zelltrümmer zurückzuhalten.

Die Phagensuspension wird durch Passage über eine Kartusche (Abbildung) bei einer Ionenstärke von 0,5 bis 0,7 M NaCl effizient von zellulärer DNS befreit. Das Bettvolumen der porösen Matrix ist so zu wählen, daß die Kapazität der aus den lysierten Zellen freigesetzten zellulären DNS entspricht (ca. 200 mg poröse Matrix pro 100 ml Lysat).

Das Filtrat wird mit EDTA (200 mM) behandelt. Bei gleichzeitigem Zusatz von 4 M Harnstoff wird die DNS der Phagen freigesetzt und mittels einer weiteren Filtration durch die Kartusche spezifisch am Anionenaustauscher adsorbiert. Anschließend wird die Kartusche mit 0,8 M NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA gewaschen und die DNS durch ca. 1 ml 1,2 M NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA eluiert.

Die auf diese Weise erhaltene Phagen-DNS kann durch Ethanol, PEG oder Isopropanol gefällt werden. Es ist auch möglich, die Phagen-DNS durch eine Dialyse zu

12

entsalzen (siehe Maniatis, T. et al.). Man erhält eine DNS hoher Reinheit.

Beispiel 3

Die Isolierung von zellulärer DNS aus Sperma geschieht wie folgt:

100 µl Sperma werden in 1 ml 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 40 mM DTE, 10 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1% Triton, 4 M Harnstoff und 20 µg/ml Proteinase K suspendiert und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei ca. 5000 g wird der Überstand in einer Kartusche über das Trenngel geführt. Die Durchflußgeschwindigkeit des Überstandes durch die Kartuschen beträgt ca. 1 ml/min.

Alternativ kann auch im "Batch"-Verfahren gearbeitet werden. Dabei wird der Überstand 15 bis 30 Minuten in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß unter Rotation mit dem Trenngel innig gemischt. Darauf folgt das Waschen des Gels (5 x im Batch-Verfahren) oder das Waschen der Kartusche mit 5 ml Waschpuffer (800 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA), gefolgt von einer Elution mit ca. 1 ml von 1,2 M NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5, 1 mM EDTA. Die Elutionsausbeute ist größer als 80%. Anschließend kann die DNS durch Dialyse oder durch Präzipitation (siehe Beispiel 1) entsalzt werden. Die DNS ist mit Restriktionszymen schneidbar und eignet sich zur Analyse im Southern-Blot-Verfahren (siehe T. Maniatis et al.).

Beispiel 4

Die Präparation von genomischer DNS aus Leberbiopsiematerial geschieht wie folgt:

Leberbiopsiematerial wird mechanisch homogenisiert durch Potter- oder vergleichbare Verfahren. Danach wird der Proteinase K-Lysispuffer (siehe Beispiel 3), 10faches Volumen, zugesetzt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die weiteren Aufarbeitungsschritte sind im Beispiel 3 beschrieben.

Beispiel 5

Die Präparation von Papillom-Virus-DNS aus Warzenbiopsie-Gewebe geschieht wie folgt:

Nach mechanischem Aufschluß (flüssiger Stickstoff, Kugelmühle, mechanisches Zerquetschen) von Warzenbiopsiematerial wird, wie im Beispiel 4 beschrieben, die 10fache Menge an Lysispuffer zugesetzt, für 6 Stunden bei 37°C inkubiert und die DNS, wie in Beispiel 3 beschrieben, aufgearbeitet. Das Verfahren liefert hochmolekulare DNS, wobei es sich um ein Gemisch von zellulärer DNS der menschlichen Zellen und Papillom-Virus-DNS aus den proteolytisch verdauten und lysierten Papillomviren handelt.

Beispiel 6

Die Präparation von CMV (Cytomegalie-Virus)-DNS aus Urin geschieht wie folgt: CMV-Viren werden in situ nach Zusatz von 4 M Harnstoff, 1% Triton, 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL-Puffer pH 7,5 lysiert. Die DNS (130 bis 150 × 10⁶ Dalton) wird freigesetzt über Adsorption an die poröse Matrix, in der in Abbildung 1 dargestellten Kartusche konzentriert und, wie in Beispiel 4 beschrieben, gewaschen. Anschließend wird die DNS eluiert, wie in Beispiel 3 beschrieben. Da sich für gewöhnlich ein Dot-Blot-Verfahren anschließt, das zur

OS 36 39 949

13

14

Bindung der DNS an eine Membran (Nitrocellulose, Nylon) ohnehin hohe Salzkonzentrationen erfordert, ist die eluierte DNS-Lösung mit Natronlauge auf 0,1 M und mit NaCl auf ca. 2 M zu adjustieren. Danach ist direkt ein Dot-Blot in den gewöhnlich verwendeten Vorrichtungen, zum Beispiel Minifold I und II von Schleicher & Schüll, möglich.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Printed: 25-01-2005

ODOCP

98107576

- Leerseite -

Fig.: 1261:14

Nummer: 36 39 949
 Int. Cl. 4: C 07 H 1/08
 Anmeldetag: 22. November 1986
 Offenlegungstag: 9. Juni 1988

3639949

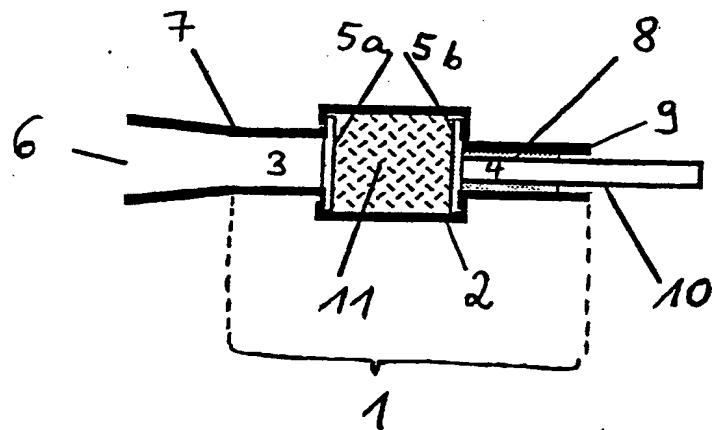


Abb.